

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23659329

研究課題名（和文）

ノックアウトマウスを用いた頭蓋内血管狭窄病変におけるミステリンの役割の解明

研究課題名（英文） Elucidation of pathological roles of mysterin in stenosis of the intracranial arteries using molecular ablation of Rnf213 in the mouse

研究代表者

小泉 昭夫 (KOIZUMI AKIO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：50124574

研究成果の概要（和文）：

Mysterin は、もやもや病の感受性遺伝子であり、R4810K 変異は東アジアのもやもや病の患者において創始者変異と考えられるが、生理的機能については十分な解明がなされていない。本研究では、mysterin ノックアウトマウスを作り血管新生、免疫機能、小胞体ストレス耐性から検討した。その結果、Akita mouse との交配で得られた F1 では糖尿病の進展が抑制された。以上からタンパク分解系に関わる機能が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Mysterin, of which function remains explored little, is a susceptibility gene for moyamoya disease, of which R4810K variant is the founder variant among Asian moyamoya patients. We investigated phenotypes of KO mouse for angiogenesis, immune function, endoplasmic (ER) stress responses. We found that diabetic phenotype in the F1 offsprings between KO mouse and Akita mice was progressed significantly slowly when compared with the progression in Akita mice. We thus concluded that mysterin is involved in protein degradation by ER-stress associated protein degradation system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：衛生学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：もやもや病・動物モデル・mysterin・Akita mouse・血管病変

1. 研究開始当初の背景

頭蓋内血管の狭窄病変は、脳梗塞など循環不全の原因として知られているが、その病態は不明である。現在のところ、原因として動脈硬化性病変と考えられている。しかし、小児やリスク要因の少ない若年女性にも多いことから、動脈硬化性病変と考えることには異論がある。最も典型的な頭蓋内血管の狭窄病変はもやもや病に見られ、動脈硬化性病変

に酷似する。だが、もやもや病の血管では、中膜下に脂肪の沈着やアテロームの形成はなく、平滑筋細胞の増殖のみが認められる。従って、もやもや病は、頭蓋内血管狭窄病変一般を代表する特徴的病理所見を有していると言える。ゆえに、もやもや病のメカニズムの解明によって、頭蓋内血管の狭窄病変メカニズムの解明に有用な情報を提供することが期待される。

(1) 着想に至った経緯：もやもや病は、頭蓋内動脈の狭窄と循環不全により側副血行路を形成する疾患であるが、メカニズムは不明である。我々は、常染色体優性遺伝形式を示す3世代家系を用いて連鎖解析を行い、最終的に17q25.3に連鎖をみとめ(J Neurol Neurosurg Psychiatry 77:1025-29, 2006, Neurology 70:2357-63, 2008, EHPM 15:94-104, 2010)その領域のPositional Cloningを行い最終的にMysterinを感受性遺伝子として見出した(特許特願 2009-244938)。Mysterin遺伝子は、591KDaの巨大蛋白をコードするが、その機能は不明である。しかし、Mysterin遺伝子の発現を抑制すると、Zebrafishで頭蓋内動脈の形成異常が生じる(特許特願 2009-244938)。我々は、Mysterin null mouseを現在作成しており、そのmouseを用いて、本課題を行うことにする。

(2) 本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ：もやもや病の感受性遺伝子については行っている研究機関は他にない。また海外においても見られない。

2. 研究の目的

もやもや病は東アジアの小児および成人で多く、小児期の脳卒中、高次機能障害を引き起こす。病変は、ウィリス輪を中心とした内径動脈終末部における平滑筋細胞増殖による狭窄病変と、その還流障害を補うため形成された代償性血管の増殖からなる。我々は、家族性もやもや病の遺伝解析により、感受性遺伝子として新たな蛋白であるMysterinを同定した。本研究は、現在作成中であるMysterin null mouseを用い、以下の3点について検討する。

(1) Null mouseの形質の同定：頭蓋内血管の形成について観察を行う。

(2) 糖尿病病態下での血管新生への影響：血管新生が亢進する病態であるAkita mouse (C96Y) (申請者に発見樹立された。)と交配し、新生血管の異常について観察する。

(3) Mysterinと他分子のcross-talk：Akita mouseにおける血管新生については、TGF- β など重要なシグナル伝達系の関与が分かっており、Mysterin null mouseのシグナルの異常から関連する分子を特定する。

3. 研究の方法

Mysterinによる脳血管狭窄のメカニズムの探索

Mysterin null mouseの形質の確認：

- ①種々の時期の血管の病変探索
- ②担い手細胞の探索



Akita mouseとの交配：糖尿病下での血管新生の修飾



MIF/TGF- β のCross-Talkの探索



平成23年度の研究：

既にMysterin欠損ヘテロ個体が得られており、ヘテロ個体オスおよびメスの交配により以下の2つの項目の検討を行う。

(1) 血管病変の探索：胎生期から成獣に至るまでの種々の時期において、頭蓋内・網膜・胎盤の3つの臓器において病変を検索する。

(2) 担い手細胞の確定：既に脾臓におけるマクロファージが強く、Mysterinを発現することが判明している。胎生期から成獣および胎盤まで骨髄系細胞を中心に検索を行う。検索は血管・肺・腎臓・胎盤について行う。

(3) Akita mouseとの交配の開始：糖尿病下での血管新生への影響を検討するために交配を開始する。

平成24年度の研究：

糖尿病下ではTGF- β のシグナルが優勢となり網膜、腎臓で血管新生が生じることが知られている。Akita mouseにおいても、このシグナルが作動し、網膜病変、腎臓病変が出ることが確立されている。そこで、本マウスを用いて、頭蓋内血管の狭窄病変の有無、網膜血管の血管増殖の量的進行度、腎臓におけるメサンギウム膜の変化について検索を行う。

(1) 病理的観察

① 頭蓋内血管の狭窄病変：小動物用核磁気共鳴装置(MRI)により血管造影(MRA)を行い、血管病変を観察する。既に小動物用MRAは京都大学医学研究科で有している。

② 網膜症：マウスの眼底については小動物用眼底カメラで撮影し、網膜症の進行度を判定する。Akita mouseにおいては、網膜症は、20-30週で出現しする。

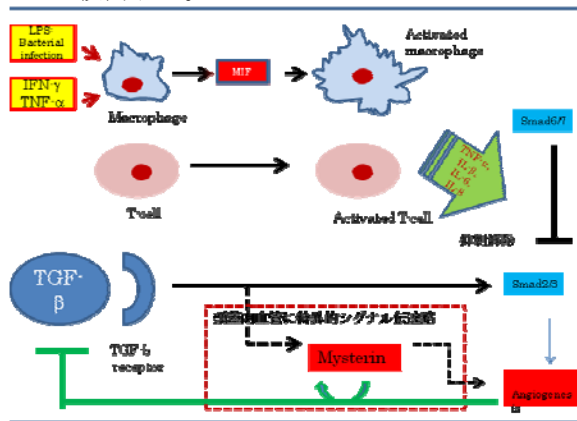
③ 腎血管障害：Akita mouse においては、腎症は 20 週で出現する。尿中アルブミンの定量とメサンギウムの電子顕微鏡的観察を行う。

(2) シグナル伝達系における cross-talk

今回検討する 2 つの血管新生に関わる MIF と TGF-β によるシグナル伝達経路は、下記の様に単純化できる。即ち、通常 MIF のシグナル伝達経路は、Smad6/7 の抑制解除により Smad2/3 の活性を上昇させ、血管新生を誘導する。MIF シグナル伝達経路と TGF-β は Smad2/3 を中心に cross-talk を行うが、この経路は全身の血管の狭窄病変である平滑筋細胞の増殖を引き起こす。

しかし、もやもや病の脳脊髄液で TGF-β が高値であること、Mysterin の変異があることから、頭蓋内では、Mysterin を介する経路が存在し、その経路は生理的条件下では TGF-β を適正な値に保つため負のフィードバックをかけている。だが、Mysterin が生じると負のフィードバック経路が作動せず、TGF-β の異常に高くなるものと考えられる。その結果、TGF-β は高値となり、より Smad2/3 が活性化されこの経路により血管新生が生じる。さらに、TGF-β 経路が先天的に活性化されている場合、極僅かな炎症機転が生じれば、Smad 6/7 による Smad2/3 の抑制機転が解除され、より TGF-β を介する経路はシグナルが増幅される。

本研究においては、本仮説に基づき、TGF-β 下の Mysterin との cross-talk について検討する。



4. 研究成果

平成 23 年度の研究：

既に Mysterin 欠損ヘテロ個体が得られており、ヘテロ個体オスおよびメスの交配により以下の 2 つの項目の検討を行った。(1) 血管病変の検索：頭蓋内病変の内頸動脈系の狭窄は認められなかった。(2) 担い手細胞の確定：既に脾臓におけるマクロファージが強く、Mysterin を発現することが判明している。胎生期から成獣および胎盤まで骨髄系細胞

を中心に検索を行う予定であるが、本年度の検索は Flow cytometry を用いた免疫系細胞の検討により脾臓 T 細胞の CD8 陽性細胞増加、CD4 陽性細胞減少を認めた。また脾臓マクロファージも増加傾向であった。(3) Akita mouse との交配の開始：糖尿病下での血管新生への影響を検討するために交配を開始した。糖尿病による耐糖能の評価、腎症の進展度の評価、血管病変への影響を見るためにコホートを設定した。

平成 24 年度の研究：

Mysterin 遺伝子による機能の解明は以下の手順で行った。(1) Mysterin null mouse の頭蓋内血管の形成の確認：Zebrafish での抑制実験による観察では、頭蓋内眼動脈の異常形成が認められた。そのため、内頸動脈終末部を胎児期から成獣まで観察した。しかし、有意な狭窄病変は見いだせなかった。(2) 糖尿病 Akita mouse との交配：糖尿病下での新生血管の異常について観察したが、同様に有意な所見は見いだせなかった。(3) Mysterin と種々既存血管の形成に関わるシグナル経路との cross-talk：Securin およびシグナル経路において cross-talk を探索した。その結果、Securin において有意な所見を見出した。上記 (1)、(2) が予想外であったため、Ubiquitin ligase の機能に注目し Akita mouse との交配において糖尿病の進展について検討を行った。Akita mouse は、Ins2 インスリンのアミノ酸が C96Y に置換された変異を持ち、生後 6 週以降インスリン分泌低下による糖尿病を引き起こす。そのメカニズムとして、インスリンの折り畳みの異常から小胞体ストレスを引き起こし膵β細胞の Apoptosis を引き起こすと考えられてきたが、近年、正常インスリンと異常インスリンが共有結合あるいは疎水結合で相互作用し、その分解が亢進することによりインスリン不足に陥り糖尿病に至ると考えられている。Akita mouse と KO マウスの交配により糖尿病の進展、β細胞のインスリン含量がよく保たれ空腹時血糖などもよく保たれていた。以上から、RNF213 の KO により分解系の亢進が抑えられ糖尿病が改善したと考えられた。今後、Ubiquitin ligase の機能を有する事から、分解系の Ubiquitin ligase と考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

(1) Yan JX, Takahashi T, Ohura T, Adachi A, Takahashi I, Ogawa E, Okuda H,

Kobayashi H, Hitomi T, Liu WY, Harada KH, Koizumi A. **Combined linkage analysis and exome sequencing identifies novel genes for familial goiter** *J Hum Genet.* 2013 in press. 査読有
doi: 10.1038/jhg.2013.20

(2) Tanaka D, Nagashima K, Sasaki M, Funakoshi S, Kondo Y, Yasuda K, Koizumi A, Inagaki N. **Exome sequencing identifies a new candidate mutation for susceptibility to diabetes in a family with highly aggregated type 2 diabetes** *Mol. Genet. Metabol.* 2013; 109(1): 112-117
査読有 doi: 10.1016/j.ymgme.2013.02.010

(3) Kobayashi H, Yamazaki S, Takashima S, Liu W, Okuda H, Yan J, Fujii Y, Hitomi T, Harada KH, Habu T, Koizumi A. **Ablation of Rnf213 retards progression of diabetes in the Akita mouse** *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 432(3):519-525 査読有
doi:10.1016/j.bbrc.2013.02.015

(4) Koizumi A, Kobayashi H, Liu W, Fujii Y, Senevirathna ST, Nanayakkara S, Okuda H, Hitomi T, Harada KH, Takenaka K, Watanabe T, Shimbo S. **P.R4810K, a polymorphism of RNF213, the susceptibility gene for moyamoya disease, is associated with blood pressure.** *Environ. Health Prev. Med.* 2013; 18(2):121-129
査読有 doi: 10.1007/s12199-012-0299-1

(5) 小林果, 人見敏明, 小泉昭夫 **もやもや病感受性遺伝子の特定** *BioClinica.* 28 巻 1 号 87-91, 2013 査読無

(6) Oshima M, Torii R, Tokuda S, Yamada S, Koizumi A. **Patient-Specific Modeling and Multi-Scale Blood Simulation for Computational Hemodynamic Study on the Human Cerebrovascular System** *Curr Pharm Biotechnol.* 2012; 13(11):2153-65
査読有 doi: 10.2174/138920112802502105

(7) Ikeda Y, Ohta Y, Kobayashi H, Okamoto M, Takamatsu K, Ota T, Manabe Y, Okamoto K, Koizumi A, Abe K. **Clinical features of SCA36: A novel spinocerebellar ataxia with motor neuron involvement (Asidan)** *Neurology.* 2012;79(4):333-341 査読有 doi:10.1212/WNL.0b013e318260436f

(8) Abe K, Ikeda Y, Kurata T, Ohta Y, Manabe Y, Okamoto M, Takamatsu K, Ohta T, Takao Y, Shiro Y, Shoji M, Kamiya T, Kobayashi H, Koizumi A. **Cognitive and affective impairments of a novel SCA/MND crossroad mutation Asidan** *Eur J Neurol.*

2012; 19(8): 1070-1078 査読有
doi: 10.1111/j.1468-1331.2012.03669.x

(9) Nanayakkara S, Komiya T, Ratnatunga N, Senevirathna STMLD, Harada KH, Hitomi T, Gobe G, Muso E, Abeysekera T, Koizumi A, Chronic Kidney Disease of Uncertain Aetiology Consortium. **Tubulointerstitial damage as the major pathological lesion in endemic chronic kidney disease among farmers in North Central Province of Sri Lanka.** *Environ. Health Prev. Med.* 2012; 17(3): 213-221
査読有 doi: 10.1007/s12199-011-0243-9

(10) 峰晴陽平, 小泉昭夫 **Mysterin 遺伝子ともやもや病** *医学のあゆみ.* 242 巻 12 号 948, 2012 査読無

(11) Liu W, Morito D, Takashima S, Mineharu Y, Kobayashi H, Hitomi T, Hashikata H, Matsuura N, Yamazaki S, Toyoda A, Kikuta K, Takagi Y, Harada KH, Fujiyama A, Herzig R, Krschek B, Zou L, Kim J, Kitakaze M, Miyamoto S, Nagata K, Hashimoto N, Koizumi A. **Identification of RNF213 as a Susceptibility Gene for Moyamoya Disease and Its Possible Role in Vascular Development.** *PLoS ONE.* 2011; 6(7): e22542 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0022542

(12) 小泉昭夫, 小林果, 人見敏明 **もやもや病関連遺伝子** *脳神経外科*40 巻 2 号:105-118, 2012 査読無

(13) Liu W, Hitomi T, Kobayashi H, Harada KH, Koizumi A. **Distribution of Moyamoya Disease Susceptibility Polymorphism p.R4810K in RNF213 in East and Southeast Asian Populations** *Neurol. Med. Chir.* 2012; 52(5): 299-303
査読有 doi:10.2176/nmc.52.299

[学会発表] (計 18 件)

(1) 劉万洋、STMLD Senevirathna、人見敏明、小林果、原田浩二、小泉昭夫「白人人口のもやもや病のゲノムワイド関連研究」
第 83 回 日本衛生学会総会
2013 年 3 月 24-26 日 金沢大学

(2) 人見敏明、小林果、奥田裕子、劉万洋、原田浩二、長船健二、浅香勲、曾根正勝、中尾一和、小泉昭夫「もやもや病特異的 iPS 細胞の血管内皮細胞への分化誘導」
第 83 回 日本衛生学会総会
2013 年 3 月 24-26 日 金沢大学

(3) 小林果、劉万洋、巖俊霞、藤井由希子、奥田裕子、人見敏明、原田浩二、小泉昭夫「Mysterin 遺伝子欠損による Akita マウス糖尿病進行の遅延」

第 83 回 日本衛生学会総会
2013 年 3 月 24-26 日 金沢大学

(4) 巖俊霞、高橋勉、大浦敏博、奥田裕子、小林果、人見敏明、劉万洋、原田浩二、小泉昭夫「Exome 解析による家族性甲状腺腫に関連する新規遺伝子の同定」

第 83 回 日本衛生学会総会
2013 年 3 月 24-26 日 金沢大学

(5) 石尾ゆきこ、竹内啓喜、山下博史、植村健吾、猪原匡史、高橋良輔、小林果、小泉昭夫「遺伝子検査で SCA36 と診断された脊髄小脳変性症の一例」

日本神経学会第 96 回近畿地方
2012 年 7 月 7 日 大阪国際会議場

(6) 池田佳生、太田康之、阿部康二、小林果、小泉昭夫、岡本美由紀、高松和弘、大田泰正、真邊泰宏、岡本幸市「小脳失調症と運動ニューロン疾患の特徴を併せ持つ新たな遺伝性疾患 Asidan の臨床病理学的特徴」

第 106 回日本内科学会中国地方会例会
2012 年 6 月 2 日 島根大学

(7) 阿部康二、倉田智子、池田佳生、森本展年、宮崎一徳、小泉昭夫「新しい ALS/SCA crossroad mutation Asidan の認知機能障害」

第 53 回日本神経学会総会
2012 年 5 月 22-25 日 東京国際フォーラム

(8) 松浦徹、明地雄司、池田佳生、森本展年、宮崎一徳、小林果、小泉昭夫、阿部康二「新しい ALS/SCA crossroad mutation Asidan の RNA 病態メカニズム」

第 53 回日本神経学会総会
2012 年 5 月 22-25 日 東京国際フォーラム

(9) 池田佳生、太田康之、小林果、岡本美由紀、高松和弘、大田泰正、真邊泰宏、岡本幸市、小泉昭夫、阿部康二「新しい ALS/SCA crossroad mutation Asidan の臨床病理学的特徴」

第 53 回日本神経学会総会
2012 年 5 月 22-25 日 東京国際フォーラム

(10) 峰晴陽平、小泉昭夫、箸方宏州、Wanyang Liu、小林果、人見敏明、菊田健一郎、高木康志、橋本信夫、宮本享「東アジアに共通するもやもや病の感受性遺伝子 Mysterin」

第 37 回 日本脳卒中学会総会
2012 年 4 月 26-28 日 福岡国際会議場

(11) 人見敏明、森戸大介、劉万洋、小林果、原田浩二、永田和宏、小泉昭夫「もやもや病感受性遺伝子である ATPase/ユビキチンリガーゼ Mysterin の生化学的検討」

第 82 回 日本衛生学会学術総会
2012 年 3 月 24-26 日 京都大学

(12) 小林果、山崎悟、高島成二、人見敏明、劉万洋、原田浩二、小泉昭夫「ゼブラフィッシュモデルによるもやもや病感受性遺伝子 mysterin の機能解析」

第 82 回 日本衛生学会学術総会
2012 年 3 月 24-26 日 京都大学

(13) 小林果、阿部康二、松浦徹、池田佳生、人見敏明、土生敏行、劉万洋、奥田裕子、原田浩二、小泉昭夫「NOP56 遺伝子イントロンにおける 6 塩基リピート拡張は脊髄小脳変性症 36 型を引き起こす」

第 82 回 日本衛生学会学術総会
2012 年 3 月 24-26 日 京都大学

(14) 人見敏明、劉万洋、小林果、原田浩二、小泉昭夫「もやもや病感受性遺伝子 mysterin の同定と血管発生への関与」

第 11 回 分子予防環境医学研究会
2012 年 1 月 27-28 日 倉敷市民会館

(15) 小林果、阿部康二、松浦徹、池田佳生、人見敏明、明地雄司、土生敏行、劉万洋、奥田裕子、小泉昭夫「ALS 様運動神経障害を伴う新規脊髄小脳変性症(SCA36)の原因遺伝子発見」

第 11 回 分子予防環境医学研究会
2012 年 1 月 27-28 日 倉敷市民会館

(16) 今西洋介、白橋徹志郎、南部旨利、西尾さやか、土市信之、中田裕也、篠崎絵里、北野裕之、西尾夏人、上野康尚、堀田成紀、久保実、重松陽介、小泉昭夫「急性脳症を契機に明らかになった全身性カルニチン欠損症の一例」

第 38 回日本マス・スクリーニング学会
2011 年 10 月 28-29 日 福井県民ホール

(17) 小泉昭夫「Searching a causative gene by next-generation sequencing in familial moyamoya cases」

アジアもやもや病カンファレンス
2011 年 6 月 2 日 グランドプリンスホテル京都

(18) 田中大祐、長嶋一昭、佐々木真弓、山田千積、船越生吾、穂友絹美代、菱澤方洋、小泉昭夫、稲垣暢也「糖尿病多発家系を対象とした全ゲノム連鎖解析による疾患感受性遺伝子の検索」

第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会
2011 年 5 月 19-21 日 札幌

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://hes.pbh.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小泉 昭夫 (KOIZUMI AKIO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：50124574

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

原田 浩二 (HARADA KOUJI)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80452340

人見 敏明 (HITOMI TOSHIAKI)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：90405275

岩沢 ころろ (IWASAWA KOKORO)

東京大学・生産技術研究所・研究員

研究者番号：30402796